

Aus dem Biochemischen Institut der Universität Freiburg i.Br.

Direktor: Professor Dr. Helmut Holzer

Zur Hemmung der Umsetzung von aktivem
Acetaldehyd an Pyruvatdecarboxylase
durch Acetaldehyd und Thiaminpyrophosphat

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung der Medizinischen Doktorwürde

einer

Hohen medizinischen Fakultät

der

Albert-Ludwigs-Universität zu Freiburg im Breisgau

Vorgelegt von

Heinrich Wilhelm Claus Bleckmann

aus Bremen

1965

Aus dem Biochemischen Institut der Universität Freiburg i.Br.

Direktor: Professor Dr. Helmut Holzer

Zur Hemmung der Umsetzung von aktivem
Acetaldehyd an Pyruvatdecarboxylase
durch Acetaldehyd und Thiaminpyrophosphat

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung der Medizinischen Doktorwürde

einer

Hohen medizinischen Fakultät

der

Albert-Ludwigs-Universität zu Freiburg im Breisgau

Vorgelegt von

Heinrich Wilhelm Claus Bleckmann

aus Bremen

1965

Dekan: Professor Dr.Karl Wilhelm Kalkoff

Referent: Professor Dr.Helmut Holzer



MEINEN ELTERN

GEWIDMET



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Die vorliegenden Untersuchungen wurden in der Zeit vom 1.Mai 1963 bis 30.April 1964 und vom 1.August 1964 bis 30.September 1964 im Biochemischen Institut der Universität Freiburg durchgeführt.

Herrn Professor Dr.Helmut H O L Z E R danke ich für die Überlassung des Themas und eines Arbeitsplatzes sowie für die Anregungen, die er mir während der Zeit dieser Arbeit gab.

Herrn Dozent Dr.Heinz Werner G O E D D E danke ich für viele praktische Hinweise.

ZUR HEMMUNG DER UMSETZUNG VON AKTIVEM
ACETALDEHYD AN PYRUVATDECARBOXYLASE
DURCH ACETALDEHYD UND THIAMINPYROPHOSPHAT

INHALTSVERZEICHNIS

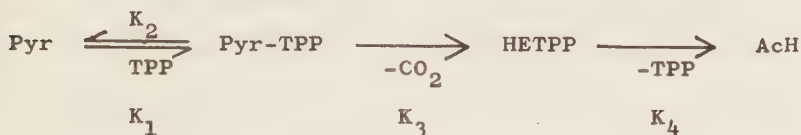
=====

	Seite
I. EINLEITUNG	1
II. PRÄPARATE	3
III. METHODEN	4
1.) Darstellung von HETPP	4
2a.) Bestimmung des Acetaldehyds im spektrophotometrischen Test	9
2b.) Photometrische Bestimmung des Acetaldehyds als 2,4-Dinitro- phenylhydrazon	10
3.) Präparation von Apopyruvat- decarboxylase	13
4.) Nachweis der Freisetzung von Acetaldehyd	15
IV. RESULTATE	21
1.) Abhängigkeit der Acetaldehyd- freisetzung aus HETPP von In- kubationszeit und Enzymmenge	21
2.) Abhängigkeit der Reaktionsge- schwindigkeit von der Substrat- konzentration	22
3.) Einfluß der Acetaldehydkonzen- tration auf die Enzymaktivität	24
4.) Einfluß von Thiaminpyrophoshat auf die Enzymaktivität	26
V. DISKUSSION	28
VI. ZUSAMMENFASSUNG	31
VII. LITERATUR	32
VIII. ABKÜRZUNGEN	34

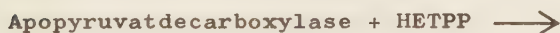
I. EINLEITUNG

=====

HOLZER und BEAUCAMP ¹⁾ zeigten, daß die Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetaldehyd und Kohlendioxyd mit Pyruvat-decarboxylase nach folgender Reaktionsgleichung wiedergegeben werden kann:



Inkubiert man HETPP mit Apopyruvatdecarboxylase aus Bierhefe, so wird Thiaminpyrophosphat an das Apoenzym gebunden, wobei das Holoenzym entsteht und Acetaldehyd freigesetzt wird.



GRUBER und WESSELIUS ²⁾ zeigten, daß der aus Pyruvat freigesetzte Acetaldehyd das Enzym Pyruvatdecarboxylase unkompetitiv hemmt. Hierfür können zwei Erklärungen gefunden werden:

- 1.) Der Acetaldehyd hemmt den Umsatz von Pyruvat über das "aktive Pyruvat" (= Pyr-TPP) zu HETPP, wenn K_3 kleiner ist als K_2 und K_4 ,
oder
- 2.) der Acetaldehyd hemmt den Umsatz von HETPP zu Acetaldehyd und Thiaminpyrophosphat, wenn K_4 die kleinste Konstante ist.

Die zweite Möglichkeit wurde in der folgenden Arbeit
geprüft und beschrieben.

II. P R Ä P A R A T E
=====

Die in den Versuchen dieser Arbeit verwendeten Substanzen waren Produkte folgender Firmen:

C.F. Boehringer u. Söhne, Mannheim:

Alkohol-Dehydrogenase (als Kristallsuspension)

Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid, reduziert

E. Merck, Darmstadt:

Acetaldehyd

Thiaminpyrophosphat

Glycin

Natrium-Pyruvat

2,4-Dinitrophenylhydrazin

Riedel-de Haen A.G., Seelze-Hannover:

Dimethylformamid

Essigsäureäthylester

Radioéléments artificiels, préparés par le commissariat à l'Energie Atomique:

Acetaldehyde ^{14}C -1-2 (Solution aqueuse)

The Radiochemical Centre, Amersham, England, und

CALBIOCHEM, Los Angeles, Calif., U.S.A.:

Sodium Pyruvate - 2 - C - 14

III. M E T H O D E N

=====

1.) Darstellung von HETPP

HETPP wird als Zwischenprodukt der Pyruvatdecarboxylierung gewonnen mit einer Pyruvatoxydase aus Schweineherzmuskelhomogenat nach SCRIBA und HOLZER ³⁾. HETPP entsteht nach folgender Gleichung:



In einem 5,0 ml Warburg-Kastengefäß von 35 - 40 ml Volumen wurden inkubiert: 0,1 ml 0,1 M MgSO_4 ; 1,0 ml 0,5 M Phosphatpuffer pH 5,6; 0,3 ml 0,1 M TPP; 0,3 ml 0,1 M 2-¹⁴C-Natriumpyruvat (spezif. Aktivität: 100 000 IpM/μMol); 3,0 ml Pyruvatoxydase. Nach drei Stunden Inkubation bei 30° C wurde der Ansatz zur Fällung des Enzyms mit 70 ml heißem Methanol gemischt und in der Servall-Zentrifuge kurz bei 35 000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde im Rotationsverdampfer zur Trockene eingeeengt, der Rückstand 30 Minuten lang mit destilliertem Wasser von 25° C extrahiert und eine Stunde in der Servall-Zentrifuge bei 35 000 g zentrifugiert. Der fast klare Überstand wurde auf eine Dowex-2-Säule gegeben (Acetatform, 200 - 400 mesh, Vernetzung x8).

Die Vorbereitung und Überführung der Säule in die Acetatform und die säulenchromatographische Trennung erfolgte nach einer kombinierten Vorschrift aus den Angaben von ULLRICH und HOLZER ⁴⁾ und GOEDDE ⁵⁾.

Zur Identifizierung des HETPP im Eluat wurde mit dem LKB-Uvicord die Extinktion bei 253,7 nm registriert sowie in einem Aliquot von 0,1 ml jeder Fraktion die Radioaktivität bestimmt. Gezählt wurde im Liquid-Scintillation-Spectrometer der Firma Packard Inc., La Grange, Ill., in je 5,0 ml Dioxan-Szintillatorlösung. Diese Lösung setzte sich aus 750 ml Dioxan, 125 ml Dimethoxyäthan, 125 ml Anisol, 7 g PPO und 50 mg POPOP (geliefert von Packard) zusammen.

Die graphische Darstellung der Extinktionen bei 253,7 nm und der Radioaktivitätsverteilung in den einzelnen Fraktionen zeigt die Abbildung 1.

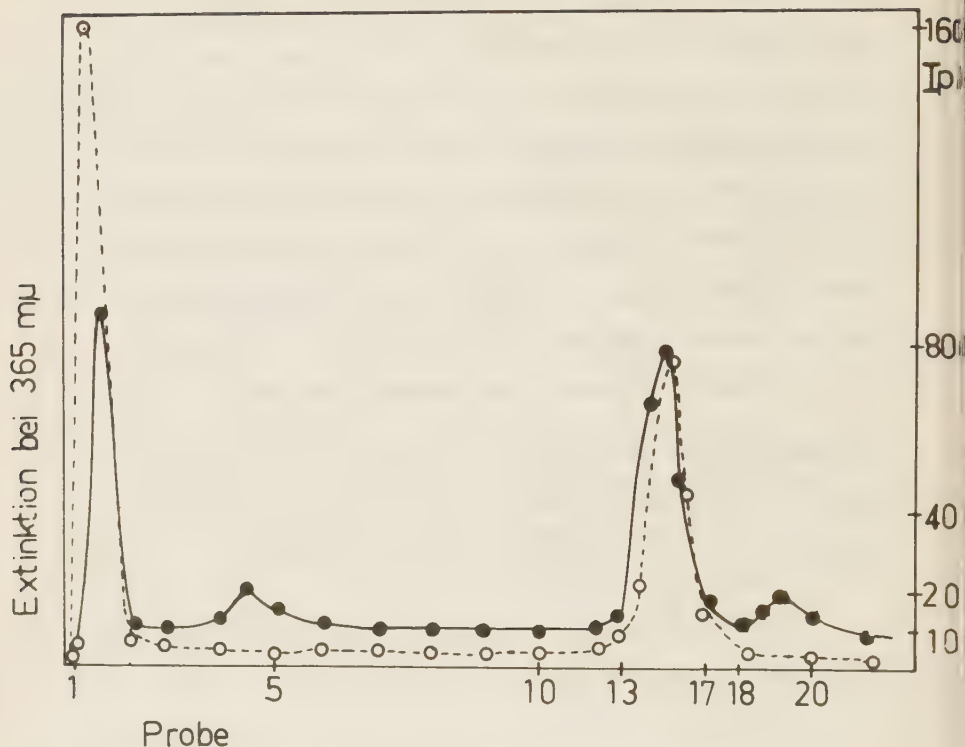


Abb. 1: Extinktion und Radioaktivitätsverteilung bei säulenchromatographischer Trennung von HETPP und TPP.

○----○ Impulsrate der Fraktionen.

Der Gipfel der Extinktionskurve fällt mit dem Gipfel der Radioaktivitätskurve zusammen. Daran kann man erkennen, in welchen Fraktionen sich ^{14}C -HETPP befindet. Der zweite, kleinere Gipfel der Extinktionskurve zeigt nicht umgesetztes TPP an.

In den Fraktionen 13 - 17 fand sich sowohl eine starke Zunahme der Extinktion als auch ein deutlicher Radioaktivitätsanstieg. Die unter diesem Gipfel liegenden Fraktionen enthielten das ^{14}C -markierte HETPP. Der

kleinere, sich anschließende Extinktionsgipfel, der aus den Fraktionen 18 - 20 bestand, wurde durch das nicht umgesetzte TPP hervorgerufen, das bei gleicher Wellenlänge absorbiert.

Zur weiteren Identifizierung des HETPP sowie zur Prüfung auf Verunreinigung mit TPP erfolgte eine Behandlung mit saurer Phosphatase und anschließend eine Papierchromatographie auf Schleicher und Schüll-Papier 2043 Mgl absteigend mit dem Lösungsmittelgemisch n-Butanol-Äthanol-Wasser (4:1:1). HOLZER, GOEDDE und ULRICH ⁶⁾ beschreiben die Spaltung von HETPP mit saurer Phosphatase in HET und Phosphat. Etwa vorhandenes TPP zerfällt in Thiamin und Phosphat. Bei der beschriebenen Papierchromatographie wandert das HET mit einem R_f -Wert von 0,3 und das Thiamin mit einem R_f -Wert von 0,25. Die Laufzeit des Chromatogramms beträgt 18 - 20 Stunden. Die Abbildung 2 zeigt ein solches typisches Chromatogramm.

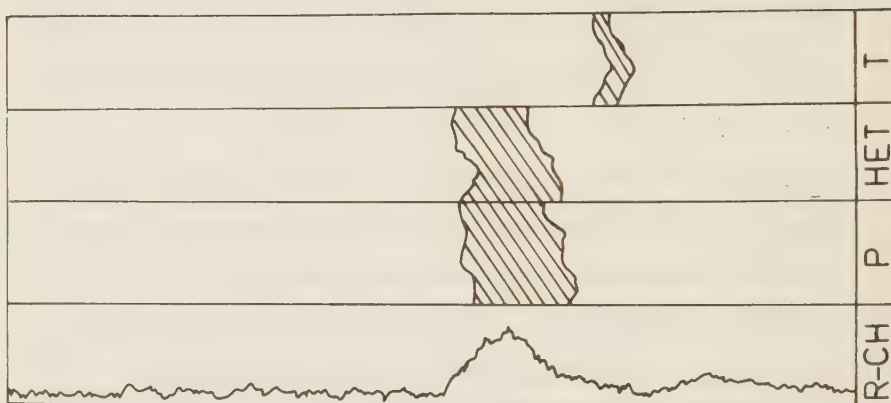


Abb.2: Papierchromatographie und Radiopapierchromatographie von HET und Thiamin.

Als Kontrollen wurden Thiamin (T) und Hydroxyäthylthiamin (HET) eingesetzt. Die zum Vergleich mitgelaufene Probe des Inkubationsansatzes (P) zeigte nur an der Stelle des Hydroxyäthylthiamins Fluoreszenz. Das HETPP des Inkubationsansatzes war ^{14}C -markiert; dadurch ließ sich die fluoreszierende Stelle auch durch Radiopapierchromatographie (R-CH) als Radioaktivitätsgipfel nachweisen.

Konnte bei der Reinheitsprüfung an der typischen Stelle des Thiamins im Chromatogramm durch den Test nach SILIPRANDI ⁷⁾ kein Thiamin nachgewiesen, dafür aber an der Hydroxyäthylthiamin-Stelle durch Radiopapierchromatographie mit dem Methandurchflußzähler FH 452 der Firma Friesseke und Höpfner ein Gipfel von ^{14}C -HET gefunden werden, so wurde das Präparat als rein betrachtet; es wurde anschließend in den Versuchen verwendet.

Eine quantitative Bestimmung des HETPP-Präparates wurde vorgenommen, indem eine Probe im Zeiss-Spektrophotometer PMQ II am vermutlichen isosbestischen Punkt bei 270,5 nm gemessen wurde. Der Extinktionskoeffizient für HETPP beträgt dort nach GOEDDE, BLUME und HOLZER ⁸⁾ $7,5 \cdot 10^6$ (cm^2/Mol).

2a.) Bestimmung von Acetaldehyd mit ADH im spektrophotometrischen Test

Der bei den Versuchen eingesetzte Acetaldehyd wurde für jeden Versuch frisch destilliert, um Polymere und Oxydationsprodukte auszuschließen. Die quantitative Bestimmung erfolgte im optischen Test nach WARBURG. Dabei ist die sich ergebende Extinktionsdifferenz im Testansatz proportional der Aldehydkonzentration.

Ausführung des Tests: In eine Küvette mit der Schichtdicke $d=1$ cm wurden pipettiert: 0,03 ml 1 M Citratpuffer pH 6,0; 2,86 ml H_2O dest.; 0,07 ml NAD-H_2 (10 mg/ml); 0,02 ml Acetaldehydlösung mit einer Konzentration von ungefähr 30 $\mu\text{Mol/ml}$. Die Reaktion wurde mit 0,02 ml ADH (1:5 verd.) gestartet.

Zur Berechnung der molaren Acetaldehyd-Konzentration gilt folgende Gleichung: Die Anzahl der μMole im Testansatz ist gleich dem Produkt aus Extinktionsdifferenz und Volumen dividiert durch das Produkt von Extinktionskoeffizient mit der Schichtdicke der Küvette. Der molare Extinktionskoeffizient für NAD-H_2 beträgt $3,3 \cdot 10^6$ (cm^2/Mol).

2b.) Photometrische Bestimmung des Acetaldehyds als
Acetaldehyd-2,4-dinitrophenylhydrazon

Acetaldehyd läßt sich als 2,4-Dinitrophenylhydrazon photometrisch bestimmen. Um die Absorptionsspektren von Acetaldehyd-2,4-dinitrophenylhydrazon und 2,4-Dinitrophenylhydrazin zu vergleichen, wurden Proben beider Substanzen mehrere Male bis zur Schmelzpunktsreinheit ($F_p = 164^\circ$, Beilstein E II, 15, 216) umkristallisiert. Einige Milligramm ließen sich in 2,0 Dimethylformamid lösen und wurden auf 0,01 mg/ml verdünnt. Ihre Absorptionsspektren wurden im Bereich von 300 - 550 nm im Spektralphotometer CARY 15 von Applied Physics Inc., Monrovia, Cf., registriert und in Abbildung 3 vereinigt.

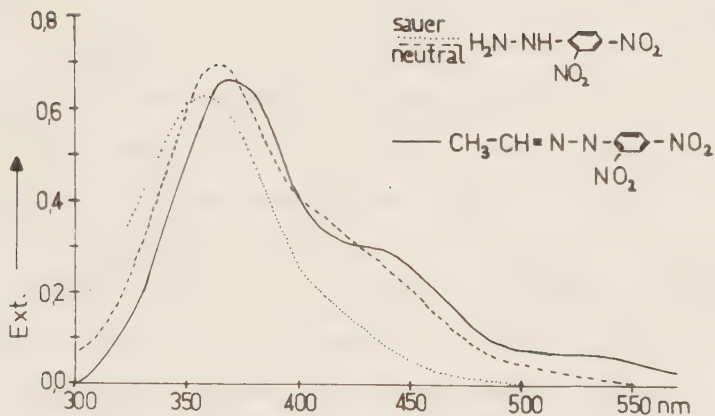


Abb.3: Absorptionsspektren von 2,4-Dinitrophenylhydrazin und Acetaldehyd-2,4-dinitrophenylhydrazon (je 0,01 mg/ml) in Dimethylformamid. Dabei liegen die Extinktionsmaxima für das Hydrazin bei 357 - 363 nm und für das Hydrazon bei 368 nm viel zu nahe beieinander für eine Bestimmung des Hydrazons durch Extinktionsdifferenzmessung.

Um den Acetaldehyd im Testansatz komplett zu binden, wurde 2,4-Dinitrophenylhydrazin im Überschuß zugesetzt. Das gebildete Acetaldehyd-2,4-dinitrophenylhydrazon kann photometrisch aber nur dann quantitativ bestimmt werden, wenn das überschüssige 2,4-Dinitrophenylhydrazin vorher abgetrennt worden ist. Die Extinktionskurven beider Substanzen haben ihre Maxima nämlich nahe 365 nm, wie aus Abbildung 3 hervorgeht. 2,4-Dinitrophenylhydra-

zin läßt sich dünn-schichtchromatographisch nach STAHL und RANDERATH ⁹⁾ abtrennen.

Ausführung: Die Glasplatten für die Dünnschichtchromatographie wurden mit dem Gießapparat der Firma C. DESAGA, Heidelberg, begossen. Das Gemisch der beiden Substanzen wurde an die Startlinie gesetzt. Die Chromatographie erfolgte aufsteigend mit dem Lösungsmittelgemisch Benzol : Heptan (3:1). Die Laufzeit betrug 40 - 45 Minuten. Acetaldehyd-2,4-dinitrophenylhydrazon wanderte dabei mit einem R_f -Wert von 0,3, während 2,4-Dinitrophenylhydrazin an der Startlinie liegen blieb. Sobald die Trennung beendet war, wurde die Platte an der Luft getrocknet. Das Kieselgel, das den Fleck mit dem Acetaldehyd-2,4-dinitrophenylhydrazon enthielt, wurde abgekratzt und in einer Soxhlet-Apparatur mit heißem Essigsäureäthylester eluiert. Anschließend wurde das Eluat zur Trockene eingengt und in 1,0 ml Essigsäureäthylester gelöst und von einem Aliquot die Extinktion bei 365 nm gemessen (Eppendorf Photometer).

Aufstellen einer Eichkurve

Man erhält eine Eichkurve von Acetaldehyd-2,4-dinitrophenylhydrazon, wenn man die Extinktion von 3, 5, 10, 15 und 20 γ dieser Substanz graphisch darstellt. Steigende Konzentrationen ergaben einen linearen Absorptionsanstieg. Die Messungen wurden bei einer Wellenlänge von 365 nm vorgenommen (Abb. 4).

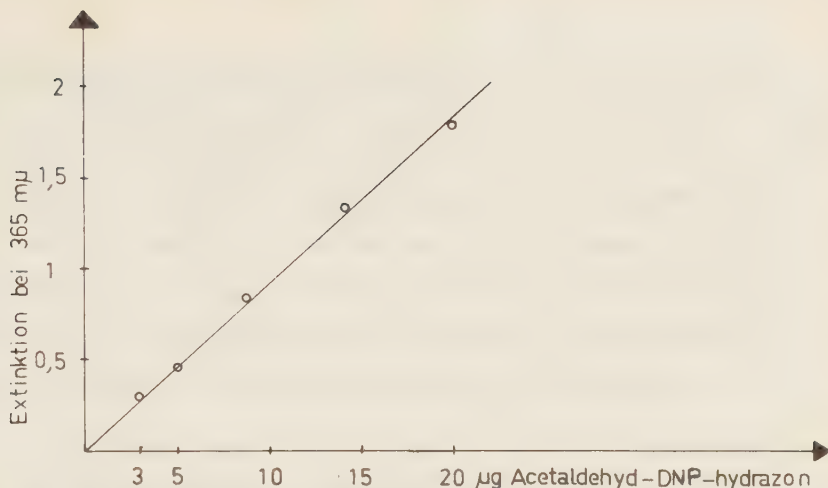


Abb.4: Eichkurve für Acetaldehyd-2,4-dinitrophenylhydrazon.

Mit der Eichkurve hatte man die Möglichkeit, die den Extinktionen entsprechenden Mengen zu bestimmen. 2,4-Dinitrophenylhydrazin, das bei 365 nm ebenfalls eine hohe Extinktion hat, wurde vorher durch Dünnschichtchromatographie abgetrennt.

3.) Darstellung von Apopyruvatdecarboxylase

Die Bereitung von Pyruvatdecarboxylase aus Bierhefe erfolgte nach HOLZER et al. ¹⁰⁾.

Apopyruvatdecarboxylase kann aus Pyruvatdecarboxylase gewonnen werden, wenn man das Holoferment in alkalischem Phosphatpuffer nach Sørensen suspendiert. In einem wässrigen Milieu zerfällt die Pyruvatdecarboxylase in ihren Eiweißbestandteil, nämlich die Apopyruvatdecarboxylase, und das Coferment; das Thiaminpyrophosphat liegt hier in ionisierter Form vor. Durch Zu-

erreicht so eine fast vollständige Trennung von Coenzym, das nach Zentrifugation gelöst im Überstand verbleibt.

Ausführung: Wenige Gramm Holoferment wurden in 3,0 ml eiskaltem Wasser gelöst und zu dem Phosphatpuffer gegeben; dieser Puffer bestand aus 90 ml 0,2 M Na_2HPO_4 und 6,0 ml 10% Glycin. Die Temperatur betrug 0°C und das pH wurde mit NaOH auf 8,9 gehalten. Das Gesamtvolumen wurde schließlich mit destilliertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt. Man ließ das Gemisch 30 Minuten lang im Eisbad stehen und gab dann während einer Dauer von 20 Minuten 45 g Ammonsulfat hinzu; dabei wurde die Flüssigkeit durch einen Magnetrührer bewegt und das pH wurde durch Zugabe von 10% NH_3 -Lösung auf 8,5 oder wenig darüber gehalten. Darauf wurde die Suspension bei 35 000 g zentrifugiert. Das Sediment stellt die Apopyruvatdecarboxylase dar und wurde mit einer 2,7 M Ammonsulfat-Lösung vom pH 8,5 gewaschen; nach erneutem, kurzen Zentrifugieren bei 35 000 g wurde der Rückstand mit 2,7 M Ammonsulfat-Lösung, deren pH nicht eingestellt war, noch einmal gewaschen.

Das gewaschene Sediment wurde nach HOLZER et al. 11) als "Ammonsulfatpaste" bei -18°C aufbewahrt; seine Haltbarkeit beträgt höchstens drei Wochen.

Um die Apopyruvatdecarboxylase zu testen, wurden Ansätze des Enzyms mit und ohne Thiaminpyrophosphat geprüft; so konnte der Grad der Abtrennung vom Coenzym festgestellt werden.

Das Enzym muß für diese Versuche frisch bereitet sein und darf in seiner spezifischen Aktivität nicht unter $8 \cdot 10^3$ Bücher-Einheiten liegen. Der Testansatz zur Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte nach HOLZER ¹¹⁾.

4.) Nachweis der Freisetzung von Acetaldehyd aus HETPP

Nach Arbeiten von HOLZER und BEAUCAMP ¹⁾ läßt sich die Acetaldehydabspaltung folgendermaßen formulieren:



Die Menge des entstehenden Acetaldehyds dient als Maß für den Umsatz von HETPP. Der entstehende freie Acetaldehyd wurde mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin abgefangen. Durch Verwendung von radioaktivem HETPP ließ sich der gebildete markierte Acetaldehyd als ^{14}C -Acetaldehyd-2,4-dinitrophenylhydrazon nachweisen und durch Messung der Radioaktivität bestimmen.

Bei den hier beschriebenen Versuchen bot sich die Verwendung von radioaktiv markiertem HETPP darüber hinaus noch deshalb an, weil so der gebildete markierte Acetaldehyd - das Reaktionsprodukt - vom zugesetzten Acetaldehyd - dem Acetaldehyd zum Hemmen - unterschieden werden konnte. Die zugesetzten Mengen von Acetaldehyd begünstigten eine quantitative Fällung des radioaktiven Acetaldehyds, da sie als Träger wirkten.

Die Schwierigkeit des Versuches bestand darin, eine geeignete Methode zur quantitativen Erfassung des aus HETPP entstehenden Acetaldehyds zu finden: HOLZER und

BEAUCAMP ¹⁾ beschreiben eine Versuchsanordnung, bei der der radioaktiv markierte Acetaldehyd aus dem Hauptraum großer Warburg-Gefäße mit Hilfe eines mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin getränkten Filterpapiers im Einsatz dieser Gefäße abgefangen wird. Um eine bessere Auszählung der Impulse zu erreichen, kann man das Eluat dieses Filters durch Dünnschichtchromatographie nach STAHL ⁹⁾ in Acetaldehyd-2,4-dinitrophenylhydrazon und 2,4-Dinitrophenylhydrazin trennen, wie unter 2b) angegeben ist. Damit wurde bei der radioaktiven Auszählung eine möglichst geringe Selbstabsorption erreicht. Die Molarität der Lösung sollte im Zeiss-Spektrophotometer bestimmt werden; dabei darf keine Verunreinigung an 2,4-Dinitrophenylhydrazin mehr vorliegen. In Vorversuchen wurde geprüft, ob dieses Verfahren eine einwandfreie Erfassung des entstehenden Acetaldehyds gewährleistet, das heißt, ob der im Hauptraum gebildete Acetaldehyd quantitativ an das mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin getränkte Papier überdestilliert und in Acetaldehyd-2,4-dinitrophenylhydrazon überführt wird.

Dieser Versuch wurde in großen Warburg-Gefäßen mit einem Volumen von 35 - 40 ml ausgeführt:

1,0 ml 0,3 M Citratpuffer pH 6,0; 0,06 ml 0,5 M MgSO_4 ;
1,12 ml (= 20 μMol) Acetaldehyd; 0,2 ml 50%-ige Tri-
chloroessigsäure, zur Beendigung der Reaktion; 0,5 ml
in 2 N HCl heißgesättigtes DNP-Hydrazin (am Filter);

nach 15, 30, 60, 90 und 120 Minuten wurde der Versuch durch Öffnen des Gefäßes und Herausnehmen des Filters beendet. Das Filter wurde mit heißem Essigsäureäthylester unter Rückfluß eluiert und vom überschüssigen 2,4-Dinitrophenylhydrazin durch Dünnschichtchromatographie getrennt, wie unter 2b) angegeben ist. So konnte man die Konzentration an Acetaldehyd-2,4-dinitrophenylhydrazon angeben. Außerdem wurde von einem Aliquot die Radioaktivität bestimmt. Dazu wurde die Substanz auf einem Aluminium-Schälchen eingetrocknet (Massenbelegung im Bereich unendlich dünner Schicht). Gezählt wurde im Handprobenwechsler FH 411 mit dem Methandurchflußzählrohr der Firma Friesseke und Höpfner, Erlangen. Damit konnte gezeigt werden, wieviel Acetaldehyd sich am Filterpapier als Hydrazon niederschlug und wieviel Acetaldehyd im Hauptraum des Versuchsgefäßes zurückblieb. Das Ergebnis dieses Versuches ist in Abbildung 5 dargestellt.

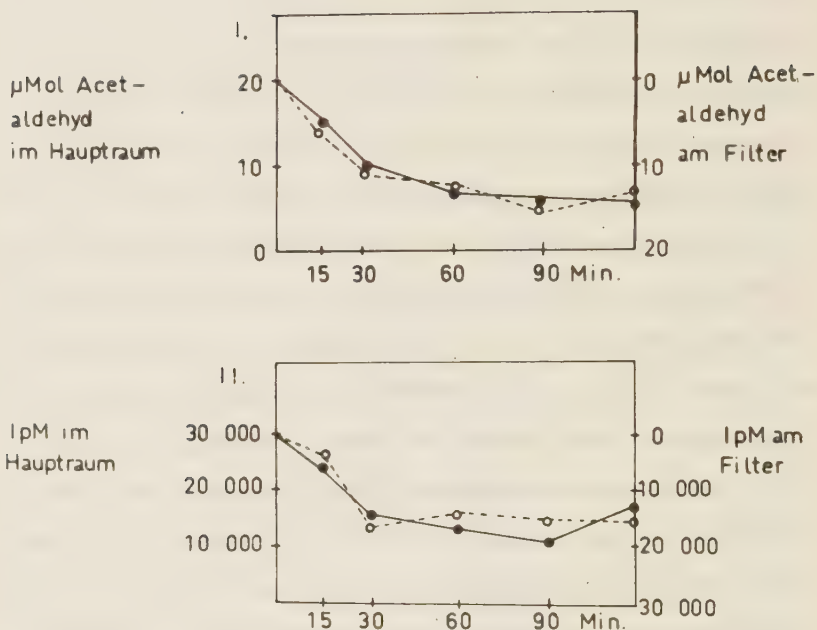


Abb.5: ●—● Acetaldehyd im Hauptraum,
○----○ Acetaldehyd am Filter.

Die Darstellung I gibt die Verteilung des Acetaldehyds an, die photometrisch ermittelt wurde; die Darstellung II zeigt die gleichen Verhältnisse, jedoch durch radioaktive Messung bestimmt.

Die Abbildung 5 zeigt, daß

- 1.) selbst nach 120 Minuten nicht mehr als 75% des Acetaldehyds aus dem Hauptraum am mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin getränkten Filter nachgewiesen werden können;

2.) die Messungen der Radioaktivitätsverteilung im Haupt-
raum und am Filter in den beiden Darstellungen nicht
übereinstimmen.

Eine Erklärung für den Verlauf der Kurven kann die Luft-
oxydation des Acetaldehyds zu Essigsäure sein, die na-
türlich kein Hydrazon bildet. Möglicherweise war schon
der eingesetzte ^{14}C -Acetaldehyd zu rund einem Viertel zu
Essigsäure oxydiert.

Eine exakte Bestimmung des aus HETPP entstehenden Acet-
aldehyds ließ sich jedoch durch eine direkte Fällung im
Reaktionsraum mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin unter Zusatz
von Träger-Acetaldehyd erreichen. Wie sich an folgenden
Versuchen zeigen läßt, führte dieses Verfahren zu befrie-
digenden Ergebnissen.

In ein Zentrifugenglas wurden pipettiert:

0,1 ml 0,5 M MgSO_4 ; 0,4 ml 1 M Citratpuffer pH 6,0;
0,3 ml Holopyruvatdecarboxylase (1,5 mg Protein/ml);
0,1 ml und 0,2 ml ^{14}C -Acetaldehyd (100 $\mu\text{Mol/ml}$ mit
einer spezifischen Aktivität von 20 000 $\text{IpM}/\mu\text{Mol}$).

Die Tabelle 1 zeigt die Werte der quantitativen Acet-
aldehydfällung.

Tab. 1: Quantitative Acetaldehydfällung

eingesetzt	Versuch Nr.	
	1	2
µMol Acetaldehyd	20	10
IpM	400 000	200 000
Fällung mit 2,4 - Dinitrophenylhydrazin		
wiedergefunden	320 000	162 000
von	400 000	200 000
% Ausbeute	80	81

Die Aufstellung zeigt, wieviel Prozent der eingesetzten Acetaldehydmenge wiedergefunden wurden.

Nach der Fällung des Acetaldehyds im oben beschriebenen Inkubationsansatz wurden die Zentrifugenröhrchen zehn Minuten in einem Wasserbad von 30° C gehalten, um eine quantitative Bindung des gesamten Acetaldehyds an 2,4-Dinitrophenylhydrazin zu garantieren. Anschließend wurde mit einer Tischzentrifuge bei 5000 g sedimentiert; der Überstand wurde verworfen und der Niederschlag, der hauptsächlich aus denaturiertem Enzym bestand, in Essigsäureäthylester suspendiert und wieder abzentrifugiert (sechs Mal in 1,5 ml), bis der Rückstand farblos war; sämtliche Überstände wurden anschließend vereinigt, mit Essigsäureäthylester auf 10,0 aufgefüllt. 0,1 ml dieser Lösung wurden auf einem Aluminiumschälchen ausgezählt wie oben beschrieben.

IV. R E S U L T A T E

=====

1.) Abhängigkeit der Acetaldehydfreisetzung aus HETPP von Inkubationszeit und Enzymmenge

Um eine Reaktion quantitativ zu messen, versucht man in der Regel Versuchsbedingungen auszuarbeiten, bei denen der Umsatz sich direkt proportional zur Reaktionszeit und zur zugesetzten Enzymmenge verhält. Das Ergebnis der hier untersuchten Reaktion ist in der Tabelle 2 wiedergegeben. In der folgenden Versuchsanordnung wurden die Acetaldehydfreisetzung geprüft:

In Zentrifugenröhrchen wurden nacheinander pipettiert:

0,01 ml 1 M MgSO_4 ; 0,2 ml 1 M Citratpuffer pH 6,0;

0,2 ml ^{14}C -HETPP (= 20 μ Mol mit einer spezifischen Aktivität von 2000 IpM/ μ Mol); 0,3 ml bzw. 0,15 ml Apopyruvatdecarboxylase; 10 μ Mol Acetaldehyd als "Hemmacetaldehyd" pro Ansatz; H_2O dest. auf 1,0 ml. Die Inkubationszeit betrug 5 bzw. 10 Minuten. Nach dieser Inkubation kam zu jedem Ansatz soviel Acetaldehyd, daß die Gesamtmenge überall 10 μ Mol betrug; das entspricht einer Endkonzentration von M/100. Sofort anschließend gab man 2,0 ml einer in 2 N HCl heißgesättigten 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Lösung dazu. Nach 30 Minuten sollte der freigewordene Acetaldehyd quantitativ als Acetaldehyd-2,4-dinitrophenylhydrazon ausgefällt sein.

Tab. 2: Acetaldehydfreisetzung aus HETPP in Abhängigkeit von Inkubationszeit und Enzymmenge

Versuch	IpM gezählt	korrigiert mit Nullwert
ohne Enzym =Nullwert	1100	0
mit halber Enzymkonzentr.	3500	2400
nach halber Zeit	4100	3000
als Standart	5300	4200
mit 10 μ Mol Acetaldehyd (=1/100 M) gehemmt	3100	2000

Die Tabelle zeigt, daß halbe Inkubationszeit und halbe Enzymkonzentration ungefähr auch halben Umsatz von HETPP bewirken. Der Versuch, der ohne Enzym mitlief, gibt die Höhe der Radioaktivität an, mit der die anderen Werte korrigiert werden müssen.

2.) Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration

Um die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration zu bestimmen, wurden Proben mit verschiedener Konzentration von ^{14}C -Acetaldehyd beschickt; die Konzentrationen lagen in einem Bereich von 10^{-4} bis 10^{-2} M.

Die Abbildung 6 zeigt das Ergebnis eines derartigen Versuches. Aus dem Kurvenverlauf läßt sich graphisch eine Michaelis-Konstante von $0,9 \cdot 10^{-3}$ ermitteln.

Ausführung und Ansatz des Versuches sind wie beschrieben: Citratpuffer, Magnesiumsulfat, Apopyruvatdecarboxylase; jedoch wurden verschiedene Mengen ^{14}C -HETPP ($24\text{ }\mu\text{Mol/ml}$), nämlich $0,435\text{ ml}$, $0,217\text{ ml}$, $0,088\text{ ml}$, $0,044\text{ ml}$, $0,022\text{ ml}$ und $0,004\text{ ml}$ dazugegeben und mit H_2O dest. auf $1,0\text{ ml}$ aufgefüllt. Die Inkubationszeit betrug wie in den anderen Versuchen 10 Minuten. Bei Beendigung des Versuches wurden jedem Ansatz $10\text{ }\mu\text{Mol}$ Acetaldehyd zugesetzt, dazu kamen $2,0\text{ ml}$ 2,4-Dinitrophenylhydrazin. Eine weitere Inkubation von 30 Minuten schloß sich an. Ein Aliquot von $0,1\text{ ml}$ wurde wie oben beschrieben auf Radioaktivität untersucht.

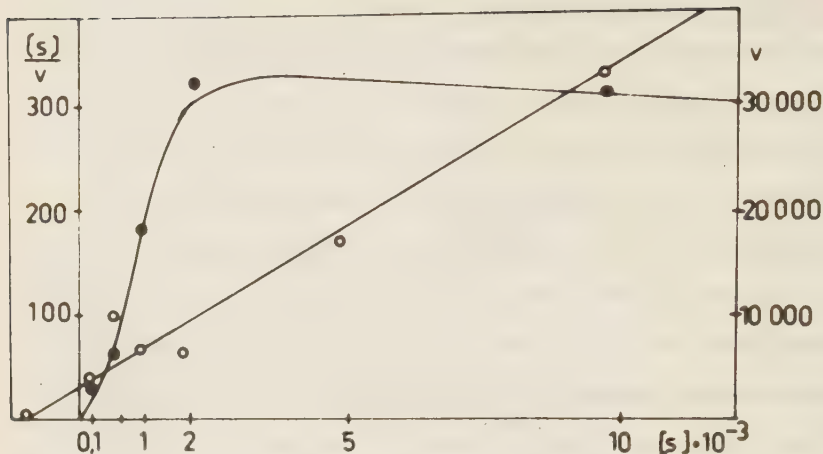


Abb. 6: Graphische Darstellung zur Ermittlung der Michaeliskonstanten.

Aufgetragen sind die Werte Geschwindigkeit (v) gegen Substratkonzentration (S) ●—● und außerdem der Quotient aus Substratkonzentration und Geschwindigkeit ($\frac{S}{v}$) gegen Substratkonzentration ○—○. Die graphische Ableitung der Michaelis-Konstanten ergibt $0,9 \cdot 10^{-3}$ M.

3.) Einfluß von Acetaldehyd auf die Aktivität der Apopyruvatdecarboxylase

Inkubiert man HETPP und Apopyruvatdecarboxylase in Gegenwart von freiem Acetaldehyd, so wird eine Hemmung der Reaktion beobachtet, die mit steigenden Konzentrationen von Acetaldehyd zunimmt.

In den Versuchen wurde ^{14}C -HETPP eingesetzt, so daß der entstandene Acetaldehyd vom zugesetzten Acetaldehyd unterschieden werden konnte.

Die Versuchsansätze setzten sich wie oben angegeben zusammen aus Citratpuffer, Magnesiumsulfat, Apoenzym, HETPP und H_2O dest. Acetaldehyd wurde den einzelnen Ansätzen in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt und zwar $0 \cdot 10^{-3}$ M, $1 \cdot 10^{-3}$ M, $3 \cdot 10^{-3}$ M, $6 \cdot 10^{-3}$ M und $10 \cdot 10^{-3}$ M. Die Aufarbeitung der Proben entsprach der unter 1.) angeführten Folge. In der Abbildung 7 sind die gezählten Impulse der einzelnen Versuche dargestellt.

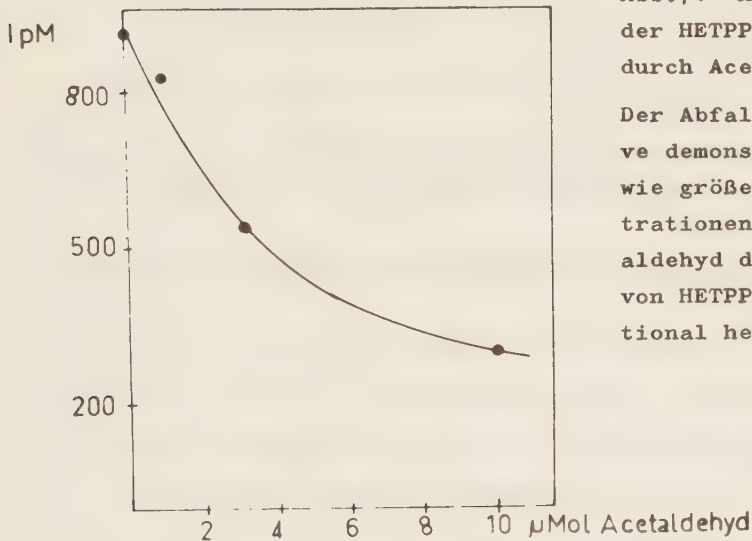


Abb.7: Hemmung der HETPP-Spaltung durch Acetaldehyd.

Der Abfall der Kurve demonstriert, wie größere Konzentrationen an Acetaldehyd den Umsatz von HETPP proportional hemmen.

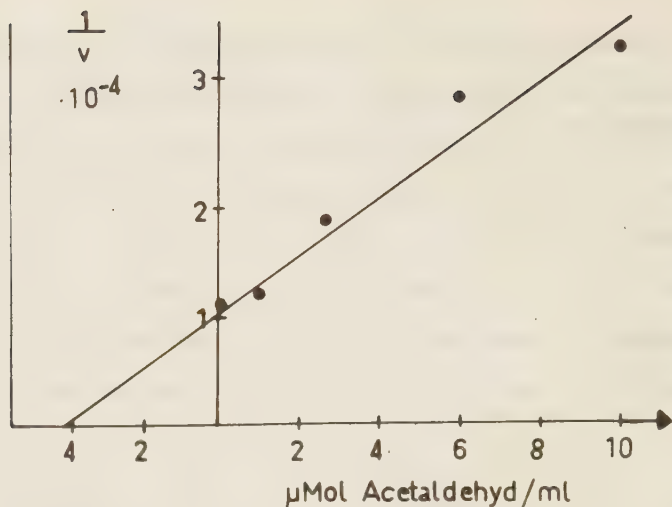


Abb.8: Inhibitor-Dissoziationskonstante der Acetaldehydhemmung.

Die graphische Darstellung der Inhibitor-Dissoziationskonstanten ergibt einen Wert von $4,2 \cdot 10^{-3}$ M.

4.) Einfluß von Thiaminpyrophosphat auf die Enzymaktivität

Gibt man zu den Ansätzen von ^{14}C -HETPP und Apopyruvat-decarboxylase Thiaminpyrophosphat hinzu, wird mit steigender Konzentration von Thiaminpyrophosphat eine deutliche Hemmung der ablaufenden Reaktion beobachtet.

Zu den schon beschriebenen Ansätzen von Citratpuffer, Magnesiumsulfat, Apoenzym und ^{14}C -HETPP wurde Thiaminpyrophosphat in folgender Konzentration gegeben:

$0 \cdot 10^{-3}$ M, $1 \cdot 10^{-3}$ M, $3 \cdot 10^{-3}$ M und $10 \cdot 10^{-3}$ M.

Die Aufarbeitung der Ansätze entsprach den vorigen.

In Abbildung 9 finden sich die Werte der Radioaktivitätsbestimmung, wie sie in den Parallelansätzen gemessen wurden.

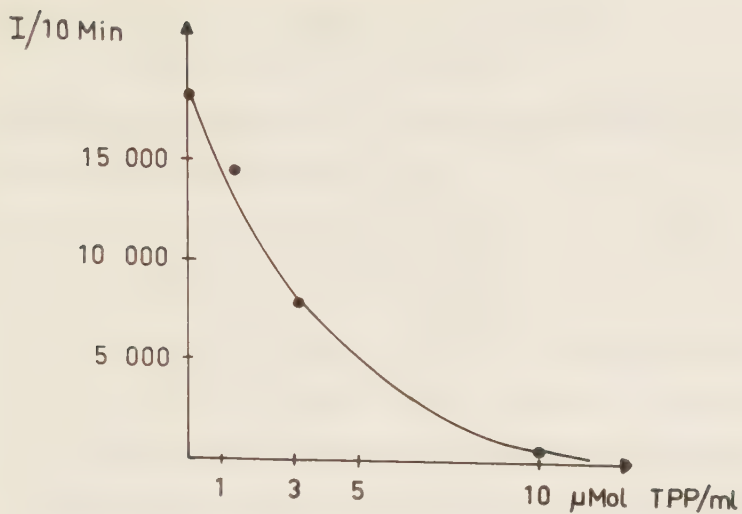


Abb.9: Hemmung des HETPP-Umsatzes durch Thiamonpyrophosphat in verschiedenen Konzentrationen.

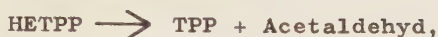
V. D I S K U S S I O N

=====

Das pyrophosphorylierte Vitamin B₁, Thiaminpyrophosphat, dient bei einer Anzahl biochemischer Reaktionen als Co-enzym. Erwähnt sei neben der Pyruvatdecarboxylierung die Pyruvatoxydation, die Bildung von Acetoin und -Acetolactat aus Pyruvat und die Transketolasereaktion. Vor über dreißig Jahren klärte WINDAUS ¹²⁾ die Struktur des Thiamin auf. NEUBERG ¹³⁾ postulierte den "nascierenden Acetaldehyd" und 1957 sagte BRESLOW ¹⁴⁾ auf Grund von Modellversuchen die Struktur des aktiven Acetaldehyds voraus; als die chemisch aktive Stelle an Modellen des Thiaminpyrophosphats fand BRESLOW das C-2-Atom des Thiazolringes. KRAMPITZ et al. ¹⁵ und ¹⁶⁾, HOLZER und Mitarbeiter ¹⁷⁾ sowie CARLSON und BROWN ¹⁸⁾ isolierten das HETPP.

SCRIBA, SCHNEIDER und HOLZER ¹⁹⁾ beschrieben 1961, daß aus einem Ansatz von HETPP und Apopyruvatdecarboxylase Acetaldehyd freigesetzt wird. Sie zeigten auch, daß zugesetztes TPP diese Acetaldehydfreisetzung stark hemmt. Man deutete das als eine HETPP verdrängende Anlagerung von TPP an die aktive Stelle des Enzyms. Die Hemmung durch TPP ist in dieser Arbeit mit gereinigtem HETPP wiederholt und bestätigt worden. Die beschriebenen Versuche zeigen, daß eine Konzentration von 10^{-2} M TPP die Reaktion völlig hemmt.

Betrachtet man die Reaktion



so gilt neben dem TPP auch der Acetaldehyd als Reaktionsprodukt. GRUBER und WESSELIUS ²⁾ beschrieben die Hemmung der Pyruvatdecarboxylierung durch Acetaldehyd; es lag nun nahe, eine Untersuchung über die Hemmung des HETPP-Umsatzes durch Acetaldehyd zu studieren. Da GRUBER und WASSENAAR ²⁰⁾ die Inhibitor-Dissoziationskonstante der Pyruvatdecarboxylierung mit $4 \cdot 10^{-3}$ M angaben, und durch diese Arbeit ebenfalls annähernd ein Wert von $4 \cdot 10^{-3}$ M gefunden wurde, kann man daraus schließen, daß es sich um eine Hemmung in der gleichen Reaktionsstufe, das heißt beim Übergang



handeln muß. Darauf wurde in der Einleitung unter I,2.) hingewiesen.

Die Acetaldehydkonzentration im Cytoplasma stationär gärender Hefezellen wird von HOLZER ²¹⁾ mit $1,9 \cdot 10^{-3}$ M angegeben. Da bei einer Konzentration von $4 \cdot 10^{-3}$ M Acetaldehyd eine 50%-ige Hemmung der besprochenen Reaktion vorliegt, ist auch in intakten, gärenden Hefezellen eine deutliche Hemmung von etwa 20 - 25% zu erwarten.

Bei der Bestimmung der Michaeliskurve für den HETPP-Umsatz an der Apopyruvatdecarboxylase fällt auf, daß die Kurve einen sigmoidalen Verlauf nimmt.

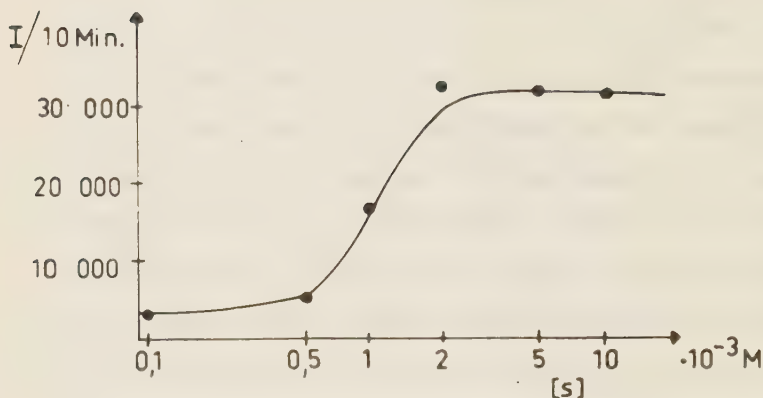


Abb.10: Michaeliskurve von HETPP an Apopyruvatdecarboxylase, aufgetragen in einem logarithmischen Maßstab.

Ähnliche Kurven wurden in jüngster Zeit von GERHARD und PARDEE ²²⁾ beschrieben. Diese geben folgende Erklärung: Der sigmoidale Verlauf deutet darauf hin, daß das die Reaktion katalysierende Enzym aus mehreren Untereinheiten besteht. Sie bezeichnen ein Enzymprotein, das aus vier Untereinheiten besteht, seinen Monomeren, als ein Tetramer. "Wird eine Untereinheit nicht vom Substrat an ihrer aktiven Stelle besetzt, verringert sich die Affinität der anderen Untereinheiten für dieses Substrat. Wenn aber eine aktive Stelle einer Untereinheit vom Substrat besetzt wird, beeinträchtigt sie nicht länger die anderen Untereinheiten und die Affinität der übrigen aktiven Stellen wird größer." Wegen des Kurvenverlaufs ist zu diskutieren, ob bei der hier beschriebenen Reaktion ähnliche Verhältnisse vorliegen.

VI. Z U S A M M E N F A S S U N G

=====

Kinetische Untersuchungen der Acetaldehyd-Freisetzung aus HETPP durch Apopyruvatdecarboxylase in Gegenwart der Reaktionsprodukte führten zu folgenden Ergebnissen:

- 1.) Die Spaltung von α - ^{14}C -HETPP in TPP und 1 - ^{14}C -Acetaldehyd wird durch zugesetzten Acetaldehyd gehemmt, und zwar bei 10^{-2} M Acetaldehyd um ungefähr 50%.
- 2.) Die gleiche Reaktion wird durch zugesetztes TPP gehemmt. Dabei genügt 10^{-2} M TPP zur vollständigen Hemmung.
- 3.) Die Michaeliskurve von Apopyruvatdecarboxylase mit HETPP wurde vermessen und aus ihr die Michaeliskonstante $K_M = 0,9 \cdot 10^{-3}$ M bestimmt.

VII. L I T E R A T U R
=====

- 1) H.HOLZER und K.BEAUCAMP: Biochim.Biophys.Acta 46,
225-243 (1961)
- 2) M.GRUBER und J.C.WESSELIUS: Biochim.Biophys.Acta
57, 171-173 (1962)
- 3) P.SCRIBA und H.HOLZER: Biochem.Z. 334, 473-486 (1961)
- 4) J.ULLRICH und H.HOLZER: Biochem.Z. 337, 345-348
(1963)
- 5) H.W.GOEDDE: Intern.Z. für Vitaminforschung 33, 1,
18-40 (1963)
- 6) H.HOLZER, H.W.GOEDDE, K.-H. GÖGGE und B.ULRICH:
Biochim.Biophys.Res.Comm. 3,
599 (1960)
- 7) D.SILIPRANDI und N.SILIPRANDI: Biochim.Biophys.
Acta 14, 52 (1954)
- 8) H.W.GOEDDE, K.G.BLUME und H.HOLZER: Biochim.Biophys.
Acta 62, 1-10 (1962)
- 9) E.STAHL: Dünnschichtchromatographie, S.198,
Springer Verlag (1962),
K.RANDERATH: Dünnschichtchromatographie, S.212,
Verlag Chemie, Weinheim/Berg-
straße (1962)
- 10) H.HOLZER, G.SCHULTZ, C.VILLAR-PALASI und
J.JÜNTGEN-SNELL: Biochem.Z. 327, 331 (1956)
- 11) F.HOLZER, H.D.SÖLING, H.W.GOEDDE und H.HOLZER:
"Methoden der enzymatischen
Chemie", S.602-605, (Hrsg.
H.U.BERGMEYER), Verlag Chemie,
Weinheim/Bergstraße (1962)

- 12) A.WINDAUS, R.TSCHESCHE, H.RUHKOPF, F.LAQUER und
F.SCHULTZ: Z.physiol.Chemie 204, 123 (1932)
- 13) C.NEUBERG und E.SIMON: Biochem.Z. 156, 324 (1925)
- 14) R.BRESLOW: J.Amer.Chem.Soc. 79, 1762 (1957)
- 15) KRAMPITZ et al.: J.Amer.Chem.Soc. 80, 5893 (1958)
- 16) L.O.KRAMPITZ, G.GREULL und I.SUZUKI: Fed.Proc. 18,
266 (1959)
- 17) H.HOLZER und K.BEAUCAMP: Angew.Chemie 71, 776 (1959)
- 18) G.L.CARLSON und G.M.BROWN: J.Biol.Chem. 235, PC 3
(1960) und J.Biol.Chem. 236,
2099 (1961)
- 19) P.SCRIBA, S.SCHNEIDER und H.HOLZER: Biochim.Biophys.
Acta 54, 115-120 (1961)
- 20) M.GRUBER und J.S.WASSENAAR: Biochim.Biophys.Acta
38, 355-357 (1960)
- 21) H.HOLZER: Über Fermentketten und ihre Bedeutung für
die Regulation des Kohlenhydrat-
stoffwechsels: 4.Kolloquium der
Gesellschaft für physiol. Chemie
am 17. und 18.April 1953 in
Mosbach/Baden
- 22) J.C.GERHARD und A.B. Pardee: Fed.Proc. 23, Nr.3,
Part 1, 727-735 (1964)

VIII. A B K Ü R Z U N G E N

=====

HETPP	2-(α -Hydroxyäthyl)-thiaminpyrophosphat
TPP	Thiaminpyrophosphat
Pyr-TPP	(= "aktives Pyruvat"), 2-(α -Hydroxy- -carboxy-äthyl)-thiaminpyrophosphat, (α -Lactyl-TPP)
PPO	2,5-Diphenyloxazole, Scintillation Grade der Fa. Packard Instrument Cie., La Grange, Ill., USA
POPOP	1,4-bis-2-(4-Methyl-5-oxazolyl)-benzol, Scintillation Grade der Fa. Packard
ADH	Alkoholdehydrogenase, der Fa. Boehringer u. Söhne GmbH., Mannheim
NAD-H ₂	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid, redu- ziert, der Fa. Boehringer u. Söhne GmbH., Mannheim

Die Bierhefe zur Präparation der Pyruvatdecarboxylase wurde uns freundlicherweise von der Brauerei GANTER, Freiburg i.Br., überlassen.

LEBENS LAUF

=====

Ich wurde am 3.Dezember 1939 in Bremen als Sohn des Facharztes für Chirurgie Dr.Heinrich Bleckmann und seiner Ehefrau Margot, geborene Deilke, geboren. In Bremen-Hemelingen besuchte ich zunächst die Volksschule, später das humanistische Alte Gymnasium zu Bremen; dort legte ich 1960 das Abitur ab.

Bis zur ärztlichen Vorprüfung studierte ich in Freiburg, später in Berlin.

Ich beabsichtige im Sommer 1966 in Freiburg mein medizinisches Staatsexamen abzulegen.

